ROL DEL OXIDO NÍTRICO EN EL EFECTO INOTRÓPICO NEGATIVO ASOCIADO CON EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

Malena Morell, Luis Gonano, Juan I Burgos y Martín Vila Petroff.
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E Cingolani, CONICET-UNLP

INTRODUCCIÓN

La osmolaridad de los tejidos esta finamente regulada bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, en diferentes situaciones patológicas como estados de deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia y diabetes, las células sufren encogimiento osmótico. A nivel cardíaco, esta alteración en el volumen celular, es capaz de promover disfunción contráctil.

El Óxido Nítrico (NO), sintetizado por la Oxido Nítrico Sintasa (NOS), ha sido definido como segundo mensajero y regulador de la función cardíaca [1]. Previamente demostramos que el hinchamiento hipotónico de miocitos cardíacos promueve la liberación de NO promoviendo un soporte contráctil [2].

El objetivo de este trabajo fue evaluar si el estrés hiperosmótico promueve la liberación de NO y, de ser así, examinar su impacto sobre la contractilidad.

MÉTODOS

Miocitos cardíacos de ratas wistar macho de 3 meses de edad fueron aislados mediante digestión enzimatica. Con el objetivo de inducir estrés hiperosmótico las células fueron perfundidas durante 5 minutos con una solución isosmótica (IS: 309 mOsm/L) y luego 20 minutos con una solución hiperosmótica (SH:440 mOsm/L).

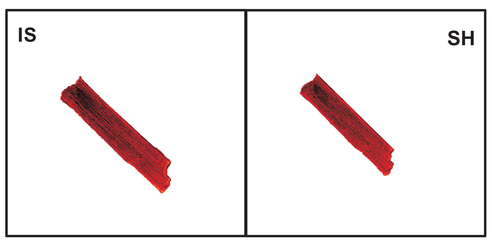
	Solución isosmótica (baja en Sodio)	Solución hiperósmotica (baja en Sodio)
NaCl	91	91
KCl	5.3	5.3
$MgCl_2$	0.5	0.5
$CaCl_2$	1	1
Glucosa	10	10
Hepes, pH 7.4	10	10
Manitol	91.5	224.5
Osmolaridad(mOsm)	309	440

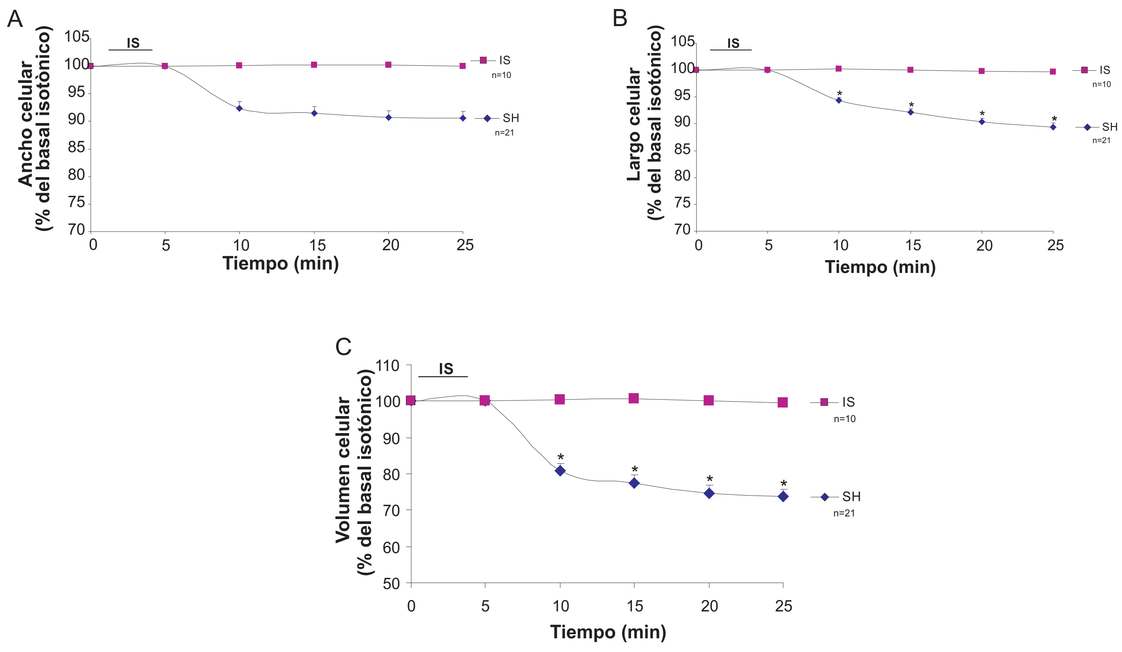
Para medir producción de NO, los miocitos fueron cargados durante 30 minutos con el indicador fluorescente DAF-FM y se tomaron imágenes de epifluorescencia en un microscopio invertido. En paralelo, se tomaron imágenes de campo claro donde se midió el cambio en el volumen celular.

El transitorio de Ca^{2+} fue registrado en células cargadas con el indicador sensible a Ca^{2+} Fura-2AM, y el acortamiento se midió mediante video detección de bordes.

RESULTADOS

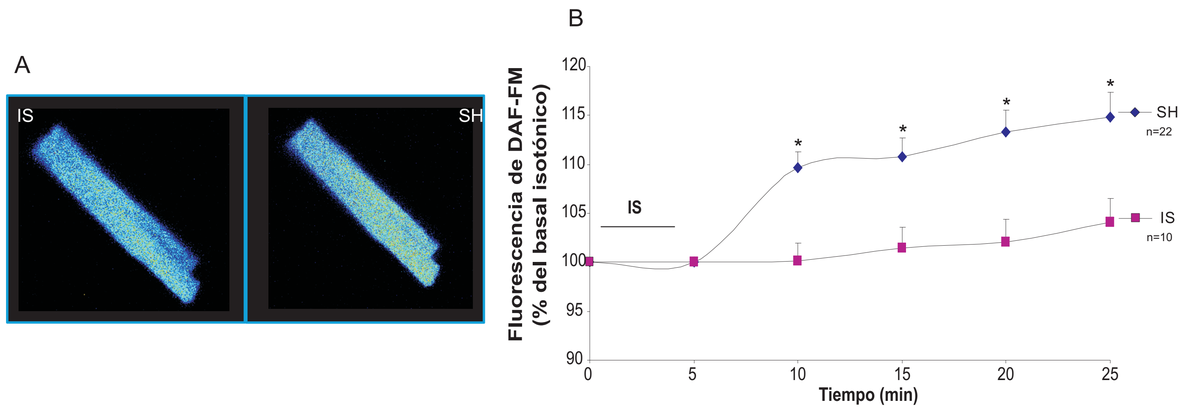
1. El estrés hiperosmótico provoca la disminución del volumen celular





A,B : Debido a la perfusión con solución hiperosmótica (SH) los miocitos se reducen tanto en ancho como en largo.
C: La perfusión con solución hiperosmótica disminuye el volumen de miocitos cardíacos.

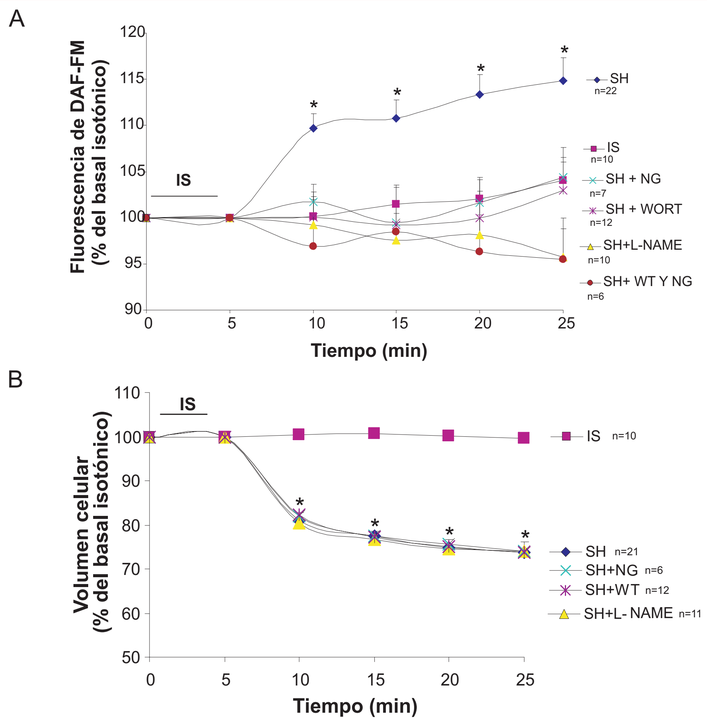
2. Someter a los miocitos cardíacos a una solución hiperosmótica promueve la liberación de Oxido Nítrico (NO)



A: Imágenes representativas de fluorescencia que muestran un aumento de la fluorescencia de DAF-FM (indicativo de producción de NO) durante la perfusión de miocitos cardíacos con solución hiperosmótica.

B: Resultados promedio donde se muestra un aumento gradual de la fluorescencia de DAF-FM durante la perfusión de miocitos con solución hiperosmótica que es significativo a los 5 minutos comparado a la perfusión con solución isosmótica.

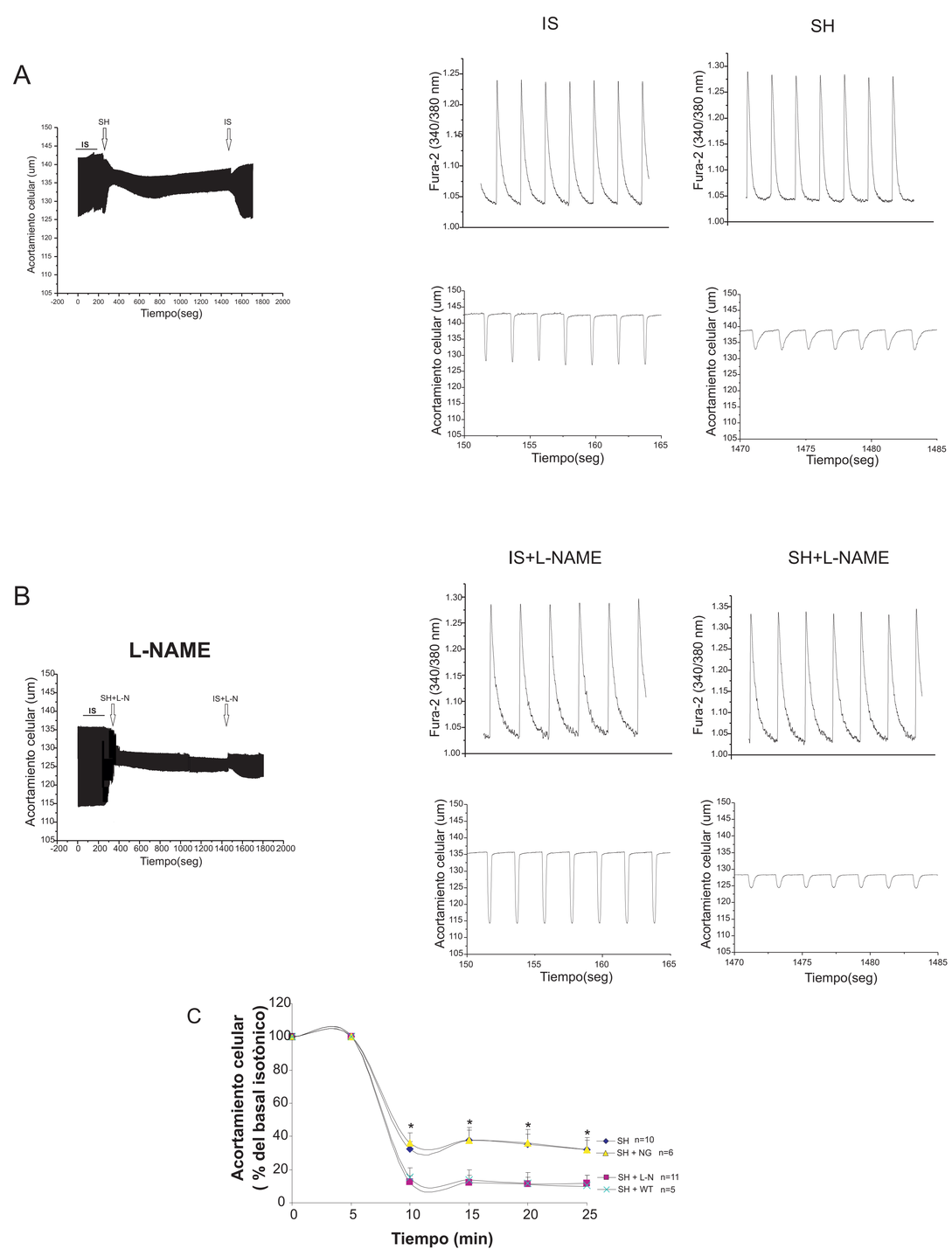
3. La nNOS y la eNOS serían las isoformas de la NOS responsables de la producción de NO durante el estrés hiperosmótico.



A: Inhibir las NOS (con L-NAME), la nNOS (con Nitroguanidina), la eNOS (con Wortmanina) o ambas (Nitroguanidina+Wortmanina) previene la producción de NO sugiriendo que ambas isoformas serían las responsables de la producción de NO durante el estrés hiperosmótico.

B Resultados promedio donde se muestra que la inhibición de la producción de NO no afecta el grado de disminución del volumen celular durante el estrés hiperosmótico.

4. El NO provee soporte inotrópico durante el estrés hiperosmótico



A : Perfil representativo de acortamiento celular donde se muestra el efecto de la perfusión de miocitos con una solución hiperosmótica (panel izquierdo).
Trazos representativos de la medición de Ca^{2+}_i (panel superior).
Trazos representativos del acortamiento celular durante el estrés hiperosmótico (panel inferior).
El cambio de perfusión de una solución isosmótica (IS) a una solución hiperosmótica (SH) cursa con un efecto inotrópico negativo (EIN) el cual no se asocia a un cambio en el contenido del Ca^{2+}_i sugiriendo que el EIN observado durante el estrés hiperosmótico podría ser consecuencia de una desensibilización de las proteínas contráctiles al Ca^{2+}_i.

B: Perfil representativo de acortamiento celular donde se muestra el efecto de la perfusión de miocitos con una solución hiperosmótica en presencia del inhibidor de las NOS: L-NAME (panel izquierdo).
Trazos representativos de la medición de Ca^{2+}_i en soluciones IS+L-NAME y SH+L-NAME(panel superior).
Trazos representativos del acortamiento celular durante el estrés hiperosmótico en presencia de L-NAME (panel inferior).
Inhibir la producción de NO exacerba el EIN sugiriendo que el NO producido durante el estrés hiperosmótico estaría generando un soporte contráctil.

C: Resultados promedio donde se muestra el EIN producido al perfundir miocitos con solución hiperosmótica (HS). Este efecto se encuentra exacerbado en presencia de L-NAME y Wortmanina (inhibidor de eNOS). Esto no sucede cuando se inhibe la nNOS (con Nitroguanidina) sugiriendo que el soporte contráctil durante el estrés hiperosmótico podría estar dado por el NO producido por la eNOS.

CONCLUSIONES

1. El estrés hiperosmótico promueve la liberación de NO y las isoformas de la NOS involucradas serían la nNOS y la eNOS.
2. El estrés hiperosmótico cursa con un EIN que podría deberse a una desensibilización de las proteínas contráctiles al Ca^{2+}_i.
3. El NO liberado por la eNOS y no por la nNOS es el que provee soporte inotrópico durante el estrés hiperosmótico.
4. La liberación de NO podría ayudar a sostener la función contráctil durante diferente situaciones patológicas asociadas con el encogimiento celular como deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia, diabetes, etc.
5. Los resultados sugieren que la disfunción contráctil que ocurre durante la disminución del volumen celular podría estar exacerbada en patologías asociadas con una baja disponibilidad de NO.

REFERENCIAS

1- Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. J Moll Cell Cardiol 2008;45:625-632.

2- Gonano LA, Morell M, Burgos JI, Dulce RA, De Giusti VC, Aiello EA, Hare JM, Vila Petroff M. Hypotonic swelling promotes nitric oxide release in cardiac ventricular myocytes: impact on swelling-induced negative inotropic effect. Cardiovasc Res 2014;104(3):455-466.